ELECTROPOLATION DEVICE

Patent Number:

JP3195485

Publication date:

1991-08-27

Inventor(s):

YANAGI KAZUO; others: 02

Applicant(s):

KAZUO YANAGI; others: 01

Requested Patent:

☐ <u>JP3195485</u>

Application Number: JP19890335500 19891225

Priority Number(s):

IPC Classification:

C12M1/00; C12N13/00; C12N15/87

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject device capable of correctly setting an introducing condition and stably introducing gene in a high efficiency by using MOSFET as a switching element in a device applying a hightension direct current pulse to a cell suspension, locally crushing the cell and introducing gene. CONSTITUTION: The aimed device is constructed so as ON and OFF of a direct current output from a hightension direct current source 1 generating a high tension direct current voltage to charge a condenser C for an electric discharge through a two-way switch 3 controlled by a charging voltage-controlling circuit 2 according to an output voltage value of a high-tension direct current source 1. Said condenser C is connected to an input I of a switch-controlling circuit 5 in which the ON and OFF are controlled by a controlling circuit 4 using MOSFET as a switching element, and a high-tension direct current pressure charged in the condenser C is connected to an electrode P installed in a chamber 6 receiving a cell suspension through an output terminal of the device by an output II of the switch-controlling circuit 5. Then, a high-tension direct current pulse is applied to the electrode P and discharged at the position to locally crush the cell, thus gene is effectively introduced into the cell.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

⑩日本国特許庁(JP)

⑩特許出願公開

@ 公 開 特 許 公 報 (A) 平3-195485

®Int. CI. ⁵

識別記号

庁内整理番号

❸公開 平成3年(1991)8月27日

C 12 M 1/00 C 12 N 13/00 15/87

B 8717-4B 2121-4B

8717-4B C 12 N 15/00

Α

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全9頁)

❷発明の名称 エレクトロポレーション装置

②特 願 平1-335500

図出 願 平1(1989)12月25日

⑩発 明 者 奥 村 益 男 東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号 オリンバス光学工業

株式会社内

⑫発 明 者 折 茂 ・ 東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号 オリンパス光学工業

株式会社内

⑦出 願 人 オリンパス光学工業株 東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号

式会社

四復代理人 弁理士 鈴江 武彦 外2名

明日日本

1. 発明の名称

エレクトロポレーション装置

2.特許請求の範囲

- (2) 上記スイッチング制御手段のON、OFF 用スイッチング業子は複数のMOSFETを並列 接続した構成であることを特徴とする簡求項(1) 記載のエレクトロボレーション装置。
 - (3) 高圧直流電源と、この高圧直流電源の出力

を立ています。 を立ている。 を立ている。 を立ている。 をでは、 ののでは、 ののででは、 ののでは、 ののでは、 ののでは、 ののでは、 ののででは、 ののででは、 ののでで、 ののでで、 ののでで、

(4) 高圧直流電源と、この高圧直流電源の出力を放電用コンデンサに充電すための開閉手段と、この開閉手段のON、OFPを制御する充電電圧制御手段と、前記放電用コンデンサに充電された電荷を電極を介して細胞懸濁液に印加放電するスイッチング制御手段と、このスイッチング制御手

段のON. OFFを制御する手段とを備えたエレクトロポレーション装置において、前記印加放電波形のピーク電圧値および同波形の時定数を測定し扱示する回路を具備したことを特徴とするエレクトロポレーション装置。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

この発明は細胞懸濁液に高圧直流パルスを印加放電させて細胞を局所的に破砕し細胞内に遺伝子を導入する等に使用されるエレクトロボレーション装置に関するものである。

[従来の技術]

細胞およびDNAの懸濁液に高電圧放電を行い動物や植物の細胞等にクーロン化DNAを導入する方法が知られており、高電圧パルスを利用して細胞融合や遺伝子導入をするエレクトロポレーション装置が市販されてきた。

このような装置では多くの場合燐酸塩緩衝食塩 (PBS)水に細胞を懸濁させ、これにクーロン DNAを添加するものであるが、遺伝子導入に必

流器RC1.2 とコンデンサC1.2 とで直流化して得られる直流高電圧Eを抵抗R3 および開閉器SWを介して放電用コンデンサCに所定の電圧Eを充電しするものが知られており、電圧が1KV程度、電流は50A程度供給できる装置が製作されている。

所定の電圧区を得る方法としては、第12図に示すような交流電圧をスライダックVTにより可要して行う方法のほか高圧直流電源の電圧設定用の可変抵抗による方法も知られている。

[発明が解決しょうとする課題]

上記した従来の装置の問題点の第一は放電用のスイッチング素子として立ち上がり時間が10μs程度と比較的遅いSCRを使用しているのでON動作の遅れにより第7図の破線曲線に示すように懸濁液に印加される実際の放電電圧のピーク値 v がコンデンサに充電した設定電圧Eより低くなってしまう問題がある。

第二点としては細胞懸濁液に印加される放電液 形の内で細胞内へのDNA導入に寄与する部分は 要な電圧、電流の大きさは細胞およびDNAの種類によって条件が異なり、高い導入効率を得るためには高電圧の印加を透確に制御しなければならない

また高電圧をコンデンサCに充電する方法として第12回に示すように交流電源をスライダック VT,電源トランスTを通して昇圧し、さらに整

放電初期の高電圧部分であるが、従来の装置はスイッチング素子としてSCRを用いていたので放電途中で出力をOFFすることができず、したがって時間幅の短い高電圧波形の繰り返し時間を短縮して導入効率を高めることができなかった。

第三点としてはコンデンサの充電電圧が所定の電圧と、つまり第6図のb充電曲線に示すように所定の飽和電圧とに達するまでに長い時間も2を必要としていたことで、このため繰り返し放電を出力する場合にその放電出力間隔が充電時間で制わされ、高圧放電の出力間隔を短縮することができないという間積もあった。

第四点としては懸濁液に印加される放電波形の時定数もピーク電圧値と共にDNA等入のための重要なファクターであるが、この時定数が予測値と実際の実効値とで大幅にずれてしまうことである。このことは細胞を含む懸濁液の抵抗値が細胞濃度や印加電圧値で変動するためで、実効的な呼定数を求めるにはオシロスコープ等を用いて波形取消しながら行う必要があるが、このような操作

は煩雑であり一般的に行なうに適した方法ではない

このように従来の装置は多くの問題を含んでいるが、この発明はこれらの問題を解決するためになされたもので、印加放電に対するスイッチング特性を大幅に向上させると共に放電波形のピーク値と時定数を正確に把握して、DNA導入効率を向上させたエレクトロボレーション装置を提供することを目的としている。

[課題を解決するための手段]

この発明は、高圧政流電源と、この充明は、高圧政流電源と、この発明は、高圧政流電源と、充電すための開閉手段のON、OFFを制御する充電された電荷を電極を介して細胞懸濁液に中かた電荷を電荷を介して細胞懸濁液に中が放電するスイッチング制御手段と、このスイッチング制御手段のON、OFF用のスイッチング素子にMOSFETを使用することを特

ひとしている.

また上記と同様な構成のエレクトロボレーション装置において、上記高圧直流電源の出力電圧は上記放電用コンデンサに充電すべき設定電圧より所定値高く設定すると共に上記充電電圧制御手段は電圧値検知手段を備え前記放電用コンデンサに対する充電電圧が前記設定電圧に達したことを検知して上記開閉手段をOFFに制御することも特徴としている。

さらに上記と同様な構成のエレクトロポレーション装置において、無胞懸濁液に印加する放電波 形のピーク電圧値および同波形の時定数を測定し 表示する回路を具備したことも特徴としている.

[作用]

このように構成することにより、スイッチング案子に立ち上がり時間が短いMOSFETを使用しているのでスイッチング特性を向上させることができる

またスイッチング業子にMOSFETを使用することによりON、OFFの制御が容易になり実

効的な時定数を短く設定でき、放電繰り返し時間 を短くすることもできる。

また放電用コンデンサに対する充電時間を早く することができるので放電繰り返し時間を短くす ることができる。

さらに懸濁液に印加される放電波形のピーク値 と時定数が連確に把握され、遺伝子導入条件を正 確に設定できる。

[実施例]

以下図面にしたがってこの発明の一実施例を 説明する。第1図はこの実施例の構成を示すす ック回路であり、放電用の高圧直流電圧を発生す る高圧直流電源1の直流出力は、水銀リレーやS CRで構成されそのON、OFFは高圧直流路 1の出力電圧値にもとずいて充電を圧制即回路2 により制御される開閉器3を介しており、さらに ンサCを充電するように構成されており、さらに このコンデンサCはMOSFETをスイッチング 業子としそのON、OFFは制御回路4により制 御されるスイッチング制御回路5の入力1に、ま

またこれら高圧直流電源1、充電電圧制御回路 2、スイッチング制御回路5、ピーク電圧&時定 数測定回路7のそれぞれを制御回路4を介して操 作制御するための操作パネル9が設けられて装置 が構成されている。

第2図は同実施例の高圧直流電源1と充電電圧 制御回路2の最略構成を示す回路図である。高圧 直流電源1は交流100V電源を電源トランスT で昇圧し整流器RC1,RC2平滑用のコンデンサ C1.C2 により倍電圧整流し、出力直流電圧値としては放電用のコンデンサ C に設定充電する電圧 E より所定値高い電圧値 V T に設定されている。なお、R1,R2 は電圧安定用でR3 は出力電流制限用の抵抗である。

充電電圧制御回路 2 は高圧直流電源 1 の出力電圧を分圧するための抵抗 R 4 および調整用抵抗 R V 1 と、この調整抵抗 R V 1 からの電圧値を基準電圧を比較し高圧直流電源 1 の出力電圧がコンデンサ C に設定充電すべき報告 に達したか否かを判定するための電圧比較器 2 b と、この電圧比較器 2 b の出力と制御 回路 4 からの制御 信号とにより開閉器 3 を O N または O F F するスイッチ駆動回路 2 c とで構成されている

スイッチング制御回路5の単位ユニットMOS は第3図に示すような回路構成になっている。同 図において二点鎖線に中はホトカプラPCを示し ており、ホトカプラPCの発光ダイオード側は制 御回路4から送られる開信号を受けこの発光ダイ

オードを慰動するトランジスタTェ1,抵抗R5,8. 7 でなる起動・増偏器の出力に接続されている。 ホ トカプラPCの出力側は抵抗R8を負荷としその 出力は抵抗R9と調整抵抗RV2を通して、抵抗 R 10を負荷とする次段の電圧増幅器のトランジス タTr2 のペースに接続され、そのコレクタはト ランジスタTr3,Tr4で梢成する駆動増幅器 の入力側に接続されている。この駆動増幅器はパ ワーMOSFBTで構成されるスイッチング業子 FBT1 を高速でスイッチングさせるため高速の NPNトランジスタTr3とPNPトランジスタ Tr4とを縦続投続したもので、ぞれぞれのベー スとエミッタを共通に接続し、この共通に接続さ れたエミッタを低インピーダンスの出力部としそ の出力は抵抗R11、12を介してスイッチング業子 FET1のゲートに接続されており、この駆動増 幅器でFET1 のゲート入力容量に十分な充電電 流を供給するようにしている。このような回路で 制御されるスイッチング素子FET1 のドレイン DとソースSはそれぞれこのスイッチング制御回

路5の入力Iと出力Ⅱとなっている。

FET1のドレインとゲート間に挿入されている定電圧ダイオードRDはゲートの耐圧保護用でありダイオードRC3は逆流防止用のもので、またドレイン、ソース間に挿入されている抵抗R13、14およびコンデンサC3はドレイン、ソース間の耐圧保護用である。FET1 駆動用のこれらの回路はこのユニットMOS内に設けられた15 V電源5 aより電源が供給される。

スイッチング素子FET1のON,OFFは関信号によるものであるので、関信号の信号幅を変えることによりONしている時間を制御できる。

第4図はスイッチング制御回路5が一般に高電圧の直流を制御する必要があるのでパワーススすッチング素子FETの耐圧の関係から同図に示すように複数の単位ユニットMOS1~nを促促疾続し、かつそれぞれの単位ユニットMOS1~nは低抗R71~R7nを介して前記起動増幅器に並列に提続されて開信号により同時にスイッチング制御がなされるように構成された実施例である。

なお、第3図に示す調整抵抗RV2は第4図に示すような縦続接続した場合における各段のFE T1~nの立ち上がり、立ち下がりの動作点を揃える機能をもっている。

第5回はピーク電圧&時定数測定回路7の機略 構成を示すプロック回路図であり、スイッチング 制御回路5の出力 II に表れる電圧は、抵抗 R 15と 調整用抵抗RV3 で構成される分圧器を介してビ ークホールド回路7aと電圧比較器7bの一方の 入力に送られ、ピークホールド回路でaでは放電 電圧のピーク値が記憶される。ピーク値を記憶す る手段としてはコンデンサにダイオードを介して 充電し記憶する等のアナログ方式とピーク値をデ ジタル量に変換して記憶する方式があるが、同図 に示す実施例は前者のアナログ方式を実施したも のである。ピークホールド回路7aのピーク値出 力はA/D交換回路7cに送られと共に分圧用の 調整抵抗RV4 によりピーク電圧の0. 37の値 にされて電圧比較 7 bの他方の入力に送られ、 **前記した調整用抵抗RV3 より送られるスイッチ**

ング制制回路5の出力電圧と比較され、この電圧 比較器7bは両入力電圧が一致したときタイマー 回路7dにタイマー停止の出力を送出する。

クロック回路7eはA/D変換回路7cやタイマー回路7dに必要なタイミングをつくるためのもので、A/D変換回路7cには変換タイミング 制御回路7tで変換タイミングに変形されて送られる。

ビークホールド回路 7 a . タイマー回路 7 d . 変換タイミング制御回路 7 f には制御回路 4 からの開信号が送られるようになっており、この信号でピーク値と放電の時定数 エの測定が開始される。

測定されたビーク値と放電の時定数ではそれぞれデータ表示回路8の数字表示器に表示されるようになっている。

このように構成されたエレクトロボレーション 装置において、高圧直流電源1は制御回路4より の起動信号により起動されその出力電圧は開閉器 3に送られると共に充電電圧制御回路2にも送られ、抵抗R4と調整抵抗RV1で構成する分圧器

開信号はトランジスタTr1を主体とする起動増幅器を介して単位ユニットMOS内のホトカプラPCの発光ダイオード側に電流を流し、その出力は前記した電圧増幅器、駆動増編器などによりパワーMOSFETで構成されるスイッチング業子FET1を導通状態にし、コンデンサCに蓄えられた電荷をチャンパー6内の懸濁液に電極Pを通して放電する。

スイッチング制御回路 5 が第 4 図に示すように 単位ユニット M O S 1 ~ n の縦続接続で構成され ている場合でもスイッチング動作は同じである。

このときスイッチング素子がMOSFETであるのでONの導通状態になるまでの立ち上がり時間が1μs以下と短く、このためその放電曲線は第7図の実線に示す理想曲線に近い形になり、ピーク電圧銀もコンデンサCに設定された設定電圧Eに近い安定した値にすることができる。

またスイッチング素子がMOSFETであるのでSCRと違いOFFすることも容易であり、したがって実効的な時定数を比較的自由に設定する

を介して電圧比較器 2 b 一方の比較入力に送られて他方の比較入力に送られる基準電圧発生器 2 a の基準電圧と比較される。比較開始のタイミングは制御回路 4 からの制御信号 O N の時点であり、またこの制御信号によりスイッチ駆動回路 2 c を介して開閉器 3 を O N にするようにしている。

制御回路 4 よりスイッチング制御回路 5 に対する関信号が送られると、第 3 図に示すようにこの

ことができる。例えば故電用コンデンサCと懸濁液できまる時定数で放電したい場合は開信号の幅を十分に長くすればよく、時定数を実効的に短くしたい場合は開信号の幅を狭くすることにより可能となる。このように自由にOFFすることができるのでパルス幅の狭い放電パルスを発生させることができ、またこのことにより放電の繰り返し時間を短くすることも可能である。

放電ビーク値と放電時定数での測定はピーク電圧&時定数測定回路ではより行われるが、ピーク値は抵抗 R 15 および調整抵抗 R V 3 で構成する分圧器を介してピークホールド回路で a に制即回路 4 よりの関信号のタイミングで保持されると共にその電圧値は A / D 変換回路で c でディジタル値に変換され所定の倍率が掛けられてデータ表示回路 8 に表示される。

一方時定数では前記開信号でタイマー回路 7 d をスタートさせると共に調整抵抗R V 3 よりの電 圧とピークホールド回路 7 a が保持しているピー ク値を調整抵抗R V 4 で 1 / e (約36.8%)に分 正した電圧とを電圧比較器7 b で比較し、両者の 電圧が等しくなった時点でタイマー回路7 d をス トップしてその間の時間を時定数でとしてデータ 表示回路8 に表示するものである。

ピーク値に影響されない時定数での測定方法として第8回に説明する方法も実施できる。つまりこの方法は開信号が送られた時点よりも1 時間後の選圧値をピークホールド回路7aに保持しすると共にこの時点でタイマー回路7dを超動し、調整低抗RV3 よりの電圧が保持された電圧値の1 / eになった時点でタイマー回路7dを停止させてその間の時間をもって時定数でとする方法である。

この測定方法によればスイッチンク業子の導通 状態が不安定でピーク値を正確に把握できないよ うな場合でも安定した測定が可能になる。

このようなピーク電圧&時定数測定回路7を設けることにより印加放電ごとにピーク値と放電時定数が把握でき、適切なエレクトロボレーション処理を行うことができる。

の回路で第1図に示した実施例の充電電圧制御回路2とピーク電圧&時定数測定回路7とで処理していた部分を処理するように構成している。

第2図、第5図おいて説明した電圧比較やピーク値保持および時定数算出などの演算処理はマイクロCPU回路10を中心にタイミング制御回路11およびアナログ処理回路12で行われ、開閉器3の開閉制御はタイミング制御回路11の指示にもとずき駆動回路により制御される。また各種

第9図はスイッチング制御回路5の単位ユニットMOS内のスイッチング第子PET1a~1cを複数個並列接続した実施例の部分回路図であり、並列接続されたFET1a~1c付近の接続を示したもので、同図においてD、S、Gは第3図における同符号部分を表している。

このような複数並列接続により大電流のスイッ チング制御が可能になる。

また第10図は他の実施例のブロック回路図であり、この実施例ではマイクロプロセッサを使用 してハード構成を簡略化している。

同図に示す実施例は各部を制御するためのマイクロCPU回路10と、このマイクロCPU回路10にデータバスを介して接続される周辺回路として各回路にタイミングの信号を送出するタイミング制御回路11と、アナログ信号をディジタル信号に変換しディジタル処理を可能にするアナログ処理回路12およびタイミング制御回路11からの制御信号により高圧直流電源1および開閉器3を制御する駆動回路13とが設けられ、これら

の制御信号やタイミング関係は前記実施例と同様 である。

この実施例のような構成をとることによりハード構成が簡易化され装置の小形化やコストの低下が期待できる。

なおこの発明は上記実施例に限定されるもので なく要旨を変更しない範囲で種々変形して実施で きる.

[発明の効果]

この発明によれば、スイッチング素子に立ち上がり時間が短いMOSFETを使用しているのでスイッチング特性が向上し、細胞懸濁液に対して設定値に近い安定した電圧を印加できる。

またスイッチング業子にMOSFETを使用することによりON、OFFの制御が容易であり実効的な時定数を短く設定でき、パルス幅の狭い放電パルスを発生させることや放電機り返し時間を短くすることもできる。

また放電用コンデンサに対する充電時間を早く することができるので放電繰り返し時間を短くす

特開平3-195485(フ)

ることができる.

さらに懸濁液に印加される放電波形のビーク値と時定数が放電の都度適確に把握され、遺伝子導入条件を正確に設定できるので常に安定した効率の高い遺伝子導入が装置や操作者に影響されずに可能になる。

4. 図面の簡単な説明

ッチング素子である M O S F E T を並列接続した 実施例の部分回路図、第 1 0 図はマイクロプロセ を使用した他の実施例のブロック回路図、第 1 1 図は従来の S C R を使用したスイッチング制御回路の部分回路図、第 1 2 図は従来の高圧直流電源 回路と充電用コンデンサとの関係を説明する回路 図である。

1 ……高圧直流電源 2 ……充電電圧制御回路

2 a ··· 基準電圧発生器 2 b ··· 電圧比較器

2 c … スイッチ駆動回路 3 … … 開閉器

4 ……制御回路

5……スイッチング制御回路

5 a … 1 5 V 電源 6 … … チャンバー

7 … … ビーク電圧&時定数測定回路

7 a…ピークホールド回路

7b… 電圧比較器

7 c ··· A / D 変換器

7 d … タイマー 回路

7 e … クロック回路

71…変換タイミング制御回路

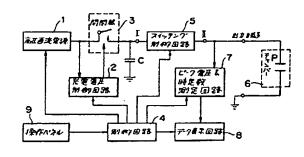
8 … … データ表示回路 9 … … 操作パネル

10…マイクロCPU回路

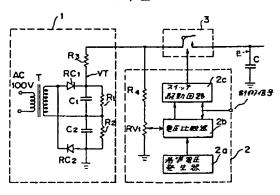
11…タイミング制御回路

12…アナログ処理回路

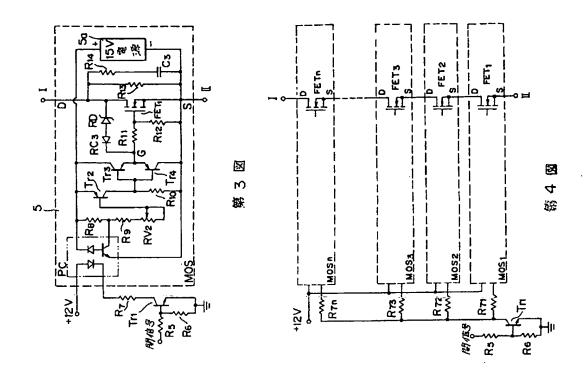
出断人 柳 壹 夫 (ほか1名)

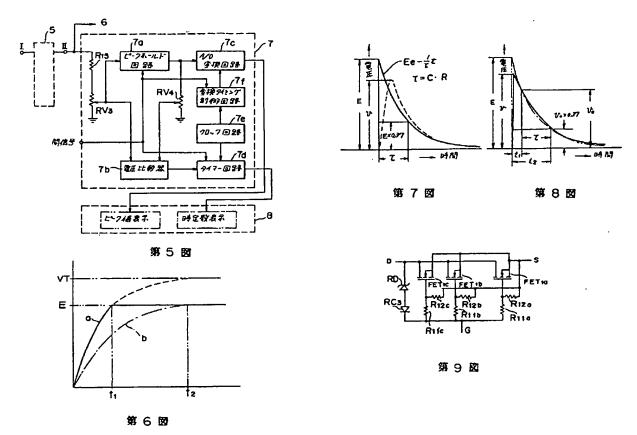


第1図

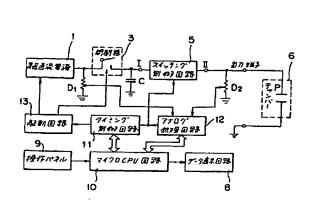


第2図

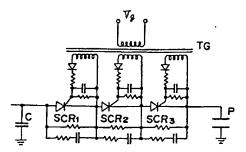




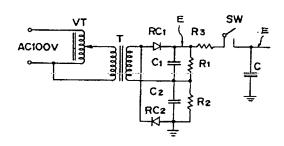
特開平3-195485 (9)



第10.图



第11 図



第 12 図